

Un microscope à deux photons pour le suivi de nanocristaux en régime de superlocalisation et en temps réel

AUTEURS

Florian Semmer (LuMIn)

Marie-Charlotte Emperauger (LuMIn)

Colin Lopez (LuMIn)

Christine Bogicevic (SPMS)

François Treussart (LuMIn)

Karen Perronet (LuMIn)

François Marquier (LuMIn)

PROJET

NanoMouv financé par le LabEx NanoSaclay et PSINano en 2018-2022 à hauteur de 45 000 €

Le suivi dynamique de nanoémetteurs a permis des avancées importantes dans la compréhension de processus biologiques : dynamique de biomolécules à la membrane cellulaire, infection virale ou transport intraneuronal. Ce sont des mesures très exigeantes en termes de (i) résolution spatiale (nanométrique) et (ii) résolution temporelle (milliseconde). Elles nécessitent souvent (iii) un accès aux trois dimensions et, selon le processus, (iv) les volumes à sonder peuvent aller de quelques dizaines de micromètres à plusieurs millimètres. Le cas des neurones est un exemple frappant, où les moteurs moléculaires (kinésines et dynéines) "marchent" sur le cytosquelette de la cellule par pas individuels d'environ 10 nm, à une cadence typique de 100 pas/s et sur des centaines de micromètres. Enfin, (v) réaliser des mesures précises à travers les tissus in vivo reste un jalon non atteint qui pourrait être abordé en utilisant l'optique adaptative, mais reste un défi à relever.

La plupart des expériences répondent aux critères (i) (ii) et (iv), au moins en 2D. Dans leur grande majorité, elles consistent à extraire des trajectoires à partir de films après leur acquisition par vidéomicroscopie d'échantillons biologiques en utilisant des émetteurs fluorescents ou des nanocristaux diffusants. Les positions des particules sont déterminées dans chaque image de la vidéo, à une cadence de 20 à 100 Hz, avec une précision de localisation de quelques dizaines de nanomètres. La microscopie vidéo peut être étendue à la dimension axiale pour répondre à la troisième condition (iii), comme par exemple dans la microscopie de diffusion interférométrique (iSCAT) ou dans les systèmes d'ingénierie de la réponse impulsionnelle (PSF). Cependant, ces techniques limitent ultimement soit la plage accessible dans la direction axiale, soit la résolution temporelle.

Une façon de contourner ce problème est de

suivre une seule particule (SPT pour le suivi de particules uniques) en déduisant la distance des émetteurs individuels à un motif d'excitation spécifique. Parmi ses implémentations technologiques, la récente méthode de microscopie MINFLUX présente une précision de localisation nanométrique exceptionnelle à une cadence typique de quelques dizaines de Hz. Elle échoue cependant actuellement à atteindre la condition (iv) car les volumes accessibles sont typiquement inférieurs au μm^3 .

Nous avons développé une méthode originale de microscopie SPT excitée à deux photons (génération de second harmonique), dans laquelle un suivi 3D rapide et précis sur un volume étendu est réalisé avec un seul dispositif de balayage. Ce dernier est constitué d'une matrice de micromiroirs (DMD) utilisée pour créer des hologrammes numériques. De manière remarquable, le DMD combiné dans un seul dispositif les fonctions multiples (i) à (v) nécessaires pour un suivi 3D rapide en profondeur dans les tissus. Nous pouvons en effet créer un motif d'excitation 3D avec lequel (i) les nanocristaux uniques sont superlocalisés à mieux que 5 nm et (ii) avec une résolution temporelle de l'ordre de 1.5 ms. Leur mouvement est (iii) suivi dans les trois dimensions en changeant la position globale du motif d'excitation 3D, et (iv) sur des centaines de micromètres. Enfin, nous pouvons (v) corriger le front d'onde du laser d'excitation. Celui-ci est un laser femtoseconde émettant dans l'infrarouge proche qui permet de se placer dans une fenêtre spectrale de transparence des tissus biologiques. La réponse non linéaire des cristaux nous permettra à terme de connaître leur orientation, faisant passer notre système d'une microscopie 4D (t, x, y, z) à une microscopie 6D, en ajoutant les angles θ (azimutal) et φ (polaire) dans les paramètres mesurés.

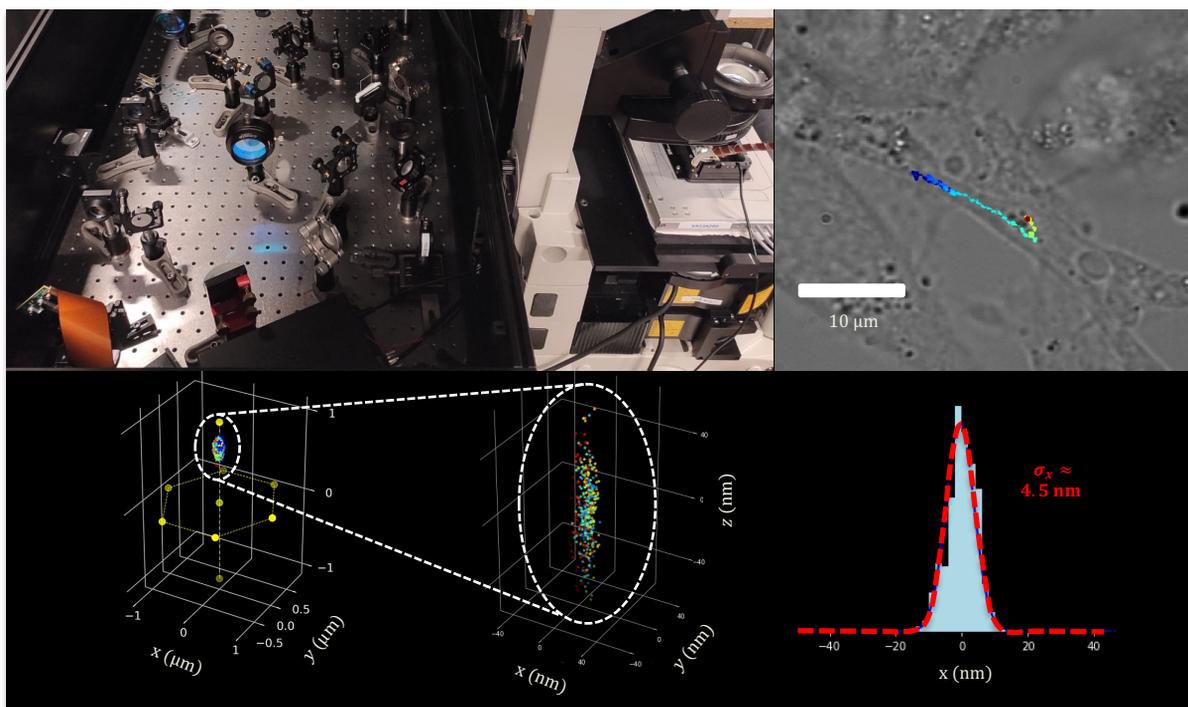


Photo d'une partie de l'expérience (la nappe de câble orange relie le DMD à l'électronique de pilotage). À droite, la trajectoire d'un nanocristal de BaTiO_3 dans une cellule en culture (neuroblastome de souris). En bas : la répétition de la mesure de position d'un nanocristal fixe permet d'évaluer la précision de localisation.